



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/09456 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. August 1990 (23.08.90)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE90/00102 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. Februar 1990 (16.02.90) (30) Prioritätsdaten: P 39 04 597.8 16. Februar 1989 (16.02.89) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BALAZS, Viktor [DE/DE]; Quellenweg 2, D-5068 Odenthal (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BALAZS-FRÖHLICH, Margit [DE/DE]; Quellenweg 2, D-5068 Odenthal (DE). (74) Anwalt: BAUER, Wulf; Wolfgang-Müller-Str. 12, D-5000 Köln 51 (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: MALIGNANCY TEST (CANCER TEST) USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION		
(54) Bezeichnung: MALIGNITÄTSTEST (KREBS-TEST) MIT VERWENDUNG VON DER POLYMERASEKETTENREAKTION		
(57) Abstract In a malignancy test (cancer test), the RNA is concentrated under the constant effect of a reliable RNase inhibitor by in vitro enzymatic multiplication of the specific RNA sequence of the substances of cancer cell origin contained in an acellular biological liquid. The product so obtained undergoes in vitro reverse transcription in order to synthesise the complementary DNA (cDNA). The product so obtained is used for repeated enzymatic synthesis of the target-specific sequence of the desired substance of cancer cell origin and thus multiplied. The product so obtained is detected by determination of the multiplication of the nucleic acids.		
(57) Zusammenfassung Bei dem Malignitätstest (Krebs-Test) wird durch in vitro enzymatische Vermehrung der spezifischen mRNA Sequenz der Substanzen von Krebszell-Ursprung aus einer azellulär biologischen Flüssigkeit die RNA unter ständiger Wirkung eines zuverlässigen RNase-Hemmers konzentriert, das erhaltene Produkt einer in vitro Reverstranskription unterzogen, um die komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren, das so erhaltene Produkt benutzt, um die Target-spezifische Sequenz der gewünschten Substanz von Krebszell-Ursprung enzymatisch in vitro wiederholt zu synthetisieren und so zu vermehren und wird das so erhaltene Produkt durch Bestimmung der Vermehrung der Nucleinsäure nachgewiesen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Malignitätstest (Krebs test) mit Verwendung von der Polymerasekettenreaktion.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis der spezifischen mRNA Sequenz (Target-Sequenz) von Substanzen von Krebszellursprung aus einer azellularen biologischen Flüssigkeit entsprechend dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Je mehr Information, je früher über die jeweilig gegebene bösartige Zellpopulation bekannt ist, desto besser kann ihr Wirt, der Patient gerettet werden. Es gibt eine ununterbrochene beidseitige Wechselwirkung zwischen dem bösartigen Prozess und dem Wirt, seit die erste malignant transformierte Zelle entstanden ist.

Diese wechselseitige Interaktion ist ein sehr komplizierter, multifaktoraler und vielseitiger Mechanismus, in dem die mRNA von Krebszellursprung eine bedeutende Rolle spielen kann, welche unten in Einzelheiten geschildert wird.

1. Wir haben erstmals berichtet, daß die Blutplasma-RNA Fraktion von Malignomträgern in protein-synthetisierenden Zell-freien System als Messenger funktioniert und die Translationsaktivität anderer mRNAs, wenn sie mit ihr in Kompetition sind, wesentlich verhindert.
2. Dies wurde in RNA-Transfer (Experimente) zu normalen Zellen später bestätigt: Das Translationsprodukt der Plasma-RNA von Malignomträgern wurde in den Rezipientzellen produziert, während die Produktion das entsprechende normale Protein drastisch gehemmt wurde.

Dieses Phänomen ist eigentlich die funktionelle Mimikry auf molekular biologischer und zellularer Ebene der Hauptmerkmale des bösartigen Prozesses selbst: Förderung der eigenen Existenz auf die Kosten des Wirtes.

3. Es wurde bekannt, daß bösartige Zellen Poly (A)⁺RNA, geschützt in Lipoproteinhülle oder gebunden zu anderen Substanzen auslassen, bzw. ausscheiden und die in der überwältigenden Mehrheit der Patienten mit bösartigen Krankheiten aus dem Blutplasma isoliert

werden kann. Messenger RNA mehr als einer Substanz von Krebszellursprung kann in der Zirkulation von Malignomträgern vorkommen.

4. Ein großes Spektrum von normalen und bösartigen Zellen ist fähig mRNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen, wenn diese durch Lipid, Lipoprotein oder durch andere Substanzen geschützt präsentiert ist. Die mRNA übt dann ihre Messenger Aktivität in den Rezipientzellen aus. Infolgedessen wird das Translationsprodukt der aufgenommenen mRNA durch diese Zellen produziert so lange bis der Nachschub durch die Zirkulation aus der Umgebung reicht.

So hat die Rezipientzelle eine neue phänotypische Eigenschaft, eine neue Produktionsfähigkeit erworben, die sie genetisch entweder nicht hat, oder nicht ausdrücken kann.

Dieses neue biologische Phänomen und dessen Bedeutung wurde erstmals durch uns erkannt und mit der Bezeichnung "Phänotypausleih" ("phenotype lending") versehen, etikettiert.

Der Phänotypausleih ist einer der wichtigsten Mechanismen, durch den die bösartigen Zellen ihre Hauptziele erreichen:

- a. Förderung ihrer eigenen Existenz,
- b. Hinderung (Hemmen) der Funktionen des Wirtes, sogar
- c. zwingen die bösartige Zellen die Wirtszellen das zu produzieren, was für den bösartigen Prozess vorteilig ist.

Die beeinflussenden Botschaften gehen im wesentlichen in zwei Richtungen:

1. Aus der malignanten Zellpopulation zu den Wirtszellen.
2. Aus einer Subpopulation der bösartigen Zellen zu anderen Subpopulationen entweder
 - a. binnen des Tumors oder
 - b. von den Muttertumorzellen zu weit entfernten metastatisierenden Tumorzell-Kolonien, und
 - c. vice versa.

Es gibt eine Anzahl von veröffentlichten klinischen und experimentellen Beobachtungen, die Phänomene in Malignität beschreiben, in denen der oben genannte Informationsaustausch durch Phänotypausleih mit mRNA wirklich operational sein kann:

A. Klinische Beobachtungen

1. Das Enzymprofil der sonst normalen Leber von Malignomträgern ist ähnlicher den bösartigen Zellen als bei normalen Menschen.
2. Normale Lymphozyten der überwältigenden Mehrheit der Patienten mit Myelom haben das Myeloma-Protein als ihr Oberflächen-Immunglobulin.
3. Normale Leukozyten der Malignomträger produzieren große Mengen von Enzymen mit basalamembran-destruierender Aktivität, die in normalem Zustand nicht tun.

B. Experimentelle Beobachtungen

1. Eine Subpopulation bösartiger Zellen, die nicht fähig ist zu metastatisieren wenn sie s.c. injiziert wird, wird aber metastatisieren, nachdem in dasselbe Tier eine Subpopulation mit metastatisierendem Potential desselben Tumors i.v. injiziert wurde.
2. Eine Subpopulation von malignanten Zellen wurde resistent gegenüber einem Medikament mit dem sie zuvor niemals in Berührung gekommen ist, wenn nur humorale Kontakte zwischen dieser und einer anderen Subpopulation, die gegenüber diesem Medikament resistent ist, etabliert wurde.

Die Liste ist nicht vollständig.

Hier muß erwähnt werden, daß Transkripte bzw. deren Fragmente von zellularen Onkogenen, die durch Übertranskription in bösartigen Krankheiten aktiviert sind, aus dem Blutplasma von Malignomträgern durch in

vitro Hybridisierung nachgewiesen werden können. Phänotypausleih durch diese Transkripte kann ähnliche Phänomene wie A1. und B1. in bösartigen Krankheiten verursachen, oder Produktionsfähigkeiten von Wachstums-Faktoren, Enzyme oder anderen Substanzen in Wirtszellen, die von dem Tumor entfernt sind, übertragen. So könnte die Umgebung dieser Wirtszellen für die ankommenden metastatisierenden Krebszellen attraktiv werden und dann diese mit Wachstums-Faktoren und anderen Substanzen füttern. Der Phänotypausleih durch mRNA von bösartigem Ursprung hemmt, verhindert gleichzeitig in den Rezipientzellen des Wirtes die eigenen Funktionen, was zu der Verminderung der lokalen und der systematischen Abwehrmechanismen des Wirtes führen kann. Kleine Fragmente der Transkripte von Krebszellursprung haben auch Hemmungsaktivität.

Das Vorkommen des Phänotypausleih durch die zirkulierende mRNA wurde in Myelom-Patienten (A2 siehe Liste) durch uns und andere untersucht und bewiesen.

Es ist gelungen, die Produktion des Myeloma-Proteins in die normalen menschlichen Lymphozyten mit der Plasma-RNA von Myeloma Patienten zu übertragen, was auch die Verminderung der Produktion von eigenen Oberflächen-Immunglobin verursacht hat. Das RNase-behandelte Sample derselben Plasma-RNA war wirkungslos.

Das RNA-Transfer Verfahren ist aber eine sehr komplizierte, beschwerliche Methode und nicht empfindlich genug um schon im Frühstadium der Bösartigkeit positive Ergebnisse zu geben.

Die spezifische mRNA-Sequenz der H und L Ketten, entsprechend der Kettenkombination dem jeweiligen Myelomaprotein wurde aus dem Blutplasma der Myelomapatienten nachgewiesen. Die Anwesenheit der mRNA in der Blutbahn ist die wichtigste Voraussetzung des Phänotypausleih. Deswegen kann der Nachweis der mRNA bzw. deren spezifischer Fragmente der Substanzen von Krebszellursprung in der Blutbahn von Malignomträgern entsprechend des Verfahrens der Erfindung als ein sensitives und gut praktizierbares Testverfahren dienen, das schon in den Frühstadien der bösartigen Krankheiten wichtige Informationen über die grundlegenden fundamentalen molekular-genetischen Veränderungen in den malignanten Zellen, deren Aktivitäten, die mögliche Wechselwirkung

zwischen Tumor und Wirt durch mRNA liefern kann, in einem Zeitpunkt wenn die Krebszellmasse mit der üblichen Methode nicht visualisierbar und für eine histologische Untersuchung nicht erreichbar ist.

Die zirkulierenden mRNA Transkripte bzw. deren spezifischen Fragmente können mit sehr empfindlichen und spezifischen Methoden nachgewiesen werden. Eine solche technische Möglichkeit ist die in vitro Hybridisierung und die andere ist die in vitro enzymatische Vermehrung der spezifischen Target-Sequenz der jeweiligen mRNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR (polymerase chain reaction).

Die Polymerase-Ketten Reaktion, die seit 1985 bekannt ist (Science 230: 1350 - 1356), ist eine zuverlässige relativ einfache Methode, um die gewünschte Sequenz von in niedriger Konzentration vorhandener DNA aus Gewebe, Zellen und sogar aus einem einzigen Haar in vitro zu synthetisieren und amplifizieren. Das amplifizierte Produkt ist dann leicht identifizierbar durch ein Spektrum von verschiedenen Methoden inklusive in vitro Hybridisierung mit entsprechenden, markierten DNA bzw. Oligonukleotid-Proben. So hat PCR Verwendung gefunden, um Flecke oder Reste von zellularen Körperflüssigkeiten (Blut, Samen) oder Körperzellen aufzuspüren und zu identifizieren.

Die mRNA Sequenzen kann man auch durch PCR in vitro amplifizieren, wenn man zuerst durch Revers-Transkription die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert und diese durch PCR amplifiziert. Diese RNA Amplifizierung wurde bisher nur für Zellen und zelluläre Körperflüssigkeiten wie Blut verwendet, besonders um RNA-Viren zu identifizieren in den Blutzellen. Bei der PCR benutzt man zwei Oligonukleotid-Primere, die komplementär sind zu den Sequenzen, die die gewünschte spezifische Sequenz flankieren, ein Primer für den 3' Strang, ein Primer für den 5' Strang, sie "bezeichnen" die Sequenz, die das DNA-Polymerase Enzym synthetisieren und amplifizieren soll.

Durch PCR kann die Target-spezifische Sequenz in einem so großen Maß vermehrt werden, daß der direkte Nachweis des Produkts möglich ist. Bei Verwendung markierter Bauelemente bzw. Primere werden die PCR-Produkte durch ihre Markierung visualisierbar, und müssen nicht durch in vitro Hybridisierung nachgewiesen werden. Die PCR hat so viele Vor-

teile, wie hohe Spezifizität, sehr große Empfindlichkeit, welche in derselben oder mit einer Größenordnung höher liegt als die in vitro Hybridisierung und sie ist einfacher, schneller und automatisierbar. Darum ist PCR besonders geeignet für den Nachweis der mRNA-Sequenz der Substanzen von Krebszellursprung aus einer azellularen biologischen Flüssigkeit wie Blutplasma und kann als empfindlicher Malignitätstest für Diagnostik, Früherkennung und Monitoring bösartiger Krankheiten dienen.

Der Nachweis der mRNA Transkripten bzw. deren spezifischen Fragmente der Substanzen von Krebszellursprung als Malignitätstest hat viele Vorteile gegenüber dem Nachweis der Substanzen selbst:

1. Die Empfindlichkeit der mRNA-Nachweismethode gemäß der Erfindung ist wesentlich größer (liegt in der Region von 10^{-18} g) als die Nachweismethoden der Translationsprodukte, also der Substanzen selbst (liegt in der Region von pg).
2. Antikörper gegen das Translationsprodukte, produziert entweder durch den Wirt, oder eingeführt (eingereicht) für Therapiezwecke, beeinflussen die Testresultate bei dem mRNA-Transkriptnachweis nicht.
3. RNA-Transkripte bzw. deren spezifischen Fragmente werden in erfaßbaren Mengen und in von degradierenden Enzyme geschützter Form nur durch bösartige Zellen ausgelassen bzw. ausgeschieden. Darum ist ihr Nachweis (in der Blutbahn) aus dem Blutplasma diagnostisch, im Gegenteil mit ihrem Translationsprodukt, das auch durch normale Zellen produziert werden kann (wie zum Beispiel: Onkogenprodukte; einige Tumormarker).
4. Die Halblebenszeit der mRNA-Transkripten ist wesentlich kürzer (60 min für onc-fos, onc-myc; 7 Stunden für CEA) als deren Translationsprodukte (mehrere Tage für Onkogen-Produkte, mehr als eine Woche für CEA).

Daraus ergeben sich wichtige praktische Vorteile für die Nachweisverfahren der mRNA-Transkripten bzw. deren spezifischen Fragmente, welche

mit dem Verfahren der Erfindung ausgenutzt werden können, als Malignitätstest:

- a. Jegliche Veränderungen können bedeutend früher und schneller erkannt werden;
 - b. schneller können Therapie-Wirkung oder Wirkungslosigkeit beobachtet und beurteilt werden;
 - c. der Therapieausgang jeder eingeleiteten Chemotherapie, oder Immuno(chemo)therapie kann man frühzeitig schon in ein bis zwei Tagen vorhersagen. Untersuchungen mit bösartigen Zellen haben gezeigt, daß die wirkungsvolle Chemotherapie zu wesentlicher Verminderung sogar zum kompletten Stillstand der Transkription der aktivierten Onkogene führt. So sind dann in dem Blutplasma mRNA Transkripte bzw. deren Fragmente von aktivierten Onkogenen nicht mehr vorhanden, oder nur in verminderter Konzentration. Persistieren die Onkogen-spezifischen mRNA Sequenzen in der Blutbahn unvermindert weiter, bedeutet das die Unwirksamkeit der eingeleiteten Chemotherapie. So kann die überflüssige Gefahr einer später unwirksam erwiesenen Chemotherapie frühzeitig vermieden und eine neue Kombination von antineoplastischen Mitteln ganz individuell für den Patienten "nach Maß geschneidert" werden.
 - d. Resistenzentstehung durch Multi-Medikament-Resistenz-Faktor kann noch frühzeitiger beobachtet werden und entsprechend behandelt werden.
5. Erkennen neuer Tumormarker oder Krebssubstanzen, die in Malignomträgern auch durch deren normale Zellen produziert werden: Ist die mRNA-Transkript bzw. deren spezifischen Fragmente von dieser Substanz in der Zirkulation, in dem Blutplasma nachweisbar, ist die Produktionsfähigkeit dieser Substanz dann nicht oder nicht nur die eigene Eigenschaft der Wirtzellen, sondern die Folge von "Phänotypausleih" durch die aus der Krebszelle stammenden zirkulierenden mRNA übertragene und so erworbene Eigenschaft.

So kann die Erscheinung und die Wirklichkeit in Einklang gebracht werden. Es gibt Phänomene, in denen die Wirklichkeit (diese Wirklichkeit) auf den ersten Blick erkennbar ist: Produktion des

Myelomaproteins als Oberflächenimmunoglobulin durch die sonst normalen Lymphozyten des Wirtes. Es gibt aber auch Erscheinungen, in denen dies nicht sofort erkennbar ist: Wenn die Produktion eines Enzymes, das gleichzeitig durch die Krebszellen, aber auch durch die sonst normale Leber in Malignomträgern produziert ist, erfolgt.

Diese Fälle können durch den Nachweis der entsprechenden mRNA bzw. deren spezifische Fragmente in der Zirkulation geklärt werden.

6. Schließlich ergeben sich mehrere therapeutische Ausnutzungsmöglichkeiten aus der Kenntnis des zirkulierenden mRNA-Profiles. Durch das Hemmen der Produktion, Ausscheidung oder der Translation der entsprechenden mRNA von Krebszellursprung kann für den Wirt nachteilige Wirkung oder für die bösartigen Zellen vorteilige Auswirkung schon sehr frühzeitig ausgeschaltet und vermieden werden, zum Beispiel durch Antisens-Oligonukleotid u.a..
 - a. Im Plasmazytom kann die Verhinderung der Übertragung der Myelomaproteinproduktionsfähigkeit auf die normalen Lymphozyten des Wirtes in einem Frühstadium der Bösartigkeit die Inhibition des Immunsystems so wesentlich verhindert werden, damit das Immunsystem die relativ kleine Tumorzellmasse ohne weitere Chemotherapie eliminieren kann, wenn die Bösartigkeit frühzeitig erkannt und entsprechend der oben erwähnten Möglichkeit behandelt wurde.
 - b. Durch die Verhinderung der Endothel-Basalmembran-destruierenden Enzyme können die in der Blutbahn anwesenden Tumorzellen die Zirkulation nicht verlassen und so nicht metastatisieren. Dies ist besonders wichtig während und nach der Operation als größere Zahl von Krebszellen in die Blutbahn gelangen kann.
 - c. Mit dem Phenotypausleih kann die niedrigere (20 - 25%) Erfolgsrate der verschiedenen Formen von Immuntherapie, mindestens teilweise erklärt werden, weil deswegen die Wirtszellen nicht ausreichend mitwirken können, oder die in vitro vermehrten und aktivierten Zellen kurz nach ihrer Verabreichung in dem Malignomträger-Wirt in ihrer Funktion gehemmt, wirkungslos

werden können.

- d. Durch Entfernung der Lipoprotein mRNA Komplexe, z. B. durch Hämoabsorption ähnlich wie für die Entfernung der gefährlichen Lipide in gewissen Formen von Hyperlipidämie schon Anwendung gefunden, oder durch andere geeignete Methoden (Plasmapherese), in dem Frühstadium der Krankheit könnte die Beeinflussung des Wirtes durch die bösartigen Zellen unterbrochen werden, der so mit voller Kraft die bösartigen Zellen vernichten könnte.

Wenn man die in vitro Amplifizierung der spezifischen mRNA-Sequenzen mit der in vitro Hybridisierung kombiniert, vergrößert die Empfindlichkeit des Malignitätstest um mindestens 4 bis 5 Größenordnungen im Vergleich zu der Hybridisierung allein oder PCR allein.

Früh bedeutet in der klinischen Onkologie Heilung, in mindestens 80 % bis 90 % der Fälle. Deshalb ist jede Methode willkommen in der klinischen Praxis, die die Früherkennung bösartiger Prozesse zeitlich und prozentual wesentlich verbessern kann.

Einen Vorsprung mehrerer Monate bei der Früherkennung und so mehrere lebenswichtige Monate für die früheingeleitete Therapie die so zur vollständigen Heilung führen kann. Das ist der wichtigste Vorteil dieser Erfindung.

Die Aktivierung von zwei oder mehreren zellularen Onkogenen durch erhöhte Transkription oder durch Mutation wird allgemein als ein sehr wichtiger Schritt in dem Entstehen, der Aufrechterhaltung und in der Progression der bösartigen Transformation betrachtet. Diese Erhöhung der Transkription kann mehrfach oder sogar das 100-fache der normalen Werte erreichen. Wegen der Besonderheiten bösartiger Zellen und der malignen Tumore können die aktivierten Onkogen-Transkripte bzw. deren Fragmente in die Blutbahn gelangen und dort geschützt oder teilweise geschützt ohne weitere wesentliche Degradierung vorhanden sein, und sie können so aus dem Blutplasma von Patienten mit aktiven bösartigen Prozeß durch eine empfindliche Methode wie in vitro Hybridisierung nachgewiesen werden. Diese Methode kann als Malignitätstest verwendet

werden und ist geeignet als Screening Test oder Verlaufskontroll-Test (Monitoring), um relativ kleine Mengen maligner Zellmasse nachzuweisen, die man mit den üblichen diagnostischen Methoden in der klinischen Praxis nicht erkennen kann.

Mit dem Verfahren dieser Erfindung kann man z. B. die Onkogen-spezifische mRNA Sequenzen auch solcher Onkogene im Blutplasma nachweisen, die in noch niedrigerer Konzentration dort vorhanden sind als andere, wie zum Beispiel die Transkripte bzw. Transkriptfragmente der Onkogene, die durch Punktmutation und nicht durch erhöhte Transkription aktiviert sind und deshalb ist ihre Konzentration niedriger in den bösartigen Zellen und nachfolgend auch im Blutplasma im Vergleich zu Onkogenen, die durch erhöhte Transkription und sogar in vivo Amplifizierung aktiviert wurden. So wird erreicht, daß das Plasma-Onkogen-Profil (Onkogene, deren mRNA-Sequenz im Blutplasma vorhanden sind), das Krebszell-Onkogen Profil (Onkogene, die in den bösartigen Zellen aktiviert sind), besser widerspiegeln kann. So könnte man aus dem Blutplasma nicht nur das Vorhandensein eines aktiven malignen Prozesses, sondern auch vorhersagen, welche Onkogene in der bösartigen Zellen mindestens teilweise aktiviert sind, und zwar schon in einem Zeitpunkt, zu dem die Bösartigkeit noch nicht visualisierbar und so für histologische und molekular-genetische Untersuchungen noch nicht erreichbar ist.

Über 50 % der Adenomen mit präkanzerösen Veränderungen im Dickdarm haben durch Punktmutation aktivierte ras Onkogene (besonders Ki-ras), während die kanzerös-veränderten Adenomen in etwas niedrigerem Prozentsatz diese Onkogene haben. Die Mutation geschah am häufigsten mit den Ki-ras Onkogenen in Position des Kodons 12, GGT wird zu GAT mutiert in beiden Zuständen. Der Malignitätstest, durchgeführt ohne vorherige Amplifizierung der oben genannten mutierten Onkogen-Sequenz aus dem Blutplasma-RNA, gab negative Ergebnisse in beiden Zuständen, nach in vitro Amplifizierung wurde der Malignitätstest positiv nur im Falle von Krebs, aber nicht bei der präkanzerösen Adenomen. Dieses Beispiel zeigt deutlich, daß die Erfindung, trotz ihrer erhöhten Empfindlichkeit, ein zuverlässiger Malignitätstest ist.

Das Ziel der Krebsforschung und der klinischen Onkologie ist die mole-

kular-genetisch kausale, rationale sinnvolle Therapie. In dieser Hinsicht sind die Kenntnisse und besonders die frühzeitigen Kenntnisse, welche Onkogene eigentlich in den bösartigen Zellen aktiviert sind, sehr wichtig. Diese Onkogene können als gute Zielscheibe einer molekular-genetisch sinnvollen Therapie dienen, und zwar an mehreren Ebenen angegriffen werden, nämlich (a) an der Gen-Ebene: Durch Verhinderung der Transkription; (b) an der Transkript-Ebene: Durch Verhinderung der Translation der aktivierten Onkogene; (c) oder an der Onkogen-Produkt-Ebene: Durch Verhinderung der Funktion des OKPs. Für a. und b. sind sehr stimulierende Ergebnisse mit Krebszell-Kulturen in vitro bekannt.

Ein Oligonukleotid mit spezifischer Sequenz für die Initiation der Proteinsynthese wird durch die Krebszellen vorzugsweise in größeren Mengen aufgenommen als durch normale Zellen und hemmt die Translation der gezielten Onkogen RNA-Transkripte mit dem Ergebnis, daß die Krebszellen ihre Eigenschaften verlieren und nicht mehr bösartig multiplizieren. Diese Möglichkeit ist ein guter Kandidat, eine kausale Therapie in der Praxis zu entwickeln.

Mit monoklonalen Antikörpern durchgeführte Experimente mit bösartigen Zellen oder mit Tumoren in Animalversuchen haben bewiesen, daß, solange das OKP neutralisiert ist durch spezifische Antikörper, der bösartige Phänotyp verschwindet. Diese Beispiele zeigen deutlich, daß die molekular genetisch kausale sinnvolle Therapie im Prinzip möglich ist, und diese nicht vorstellbar ist ohne das frühzeitige Wissen, welche Onkogene in den bösartigen Zellen aktiviert sind. Hier hilft schon früh das Onkogen-Profil des Blutplasmas mit dem Verfahren dieser Erfindung.

Wenn man die anti-Krebszell Antikörper mit chemotherapeutischen, toxischen oder radioaktiven Substanzen bindet, kann man therapeutische Wirkung in Tieren und Patienten erreichen, jedoch ist die Erfolgsrate im allgemeinen nicht sehr hoch. Mehrere Faktoren sind dafür verantwortlich, einer davon ist die Verschiedenheit in der Expression des gezielten Antigens an den verschiedenen Krebszellen derselben Tumore wegen ihrer Diversification. Bessere Ergebnisse kann man erreichen, wenn man gleichzeitig mehrere Antigene an der Zelloberfläche gezielt

immunologisch angreift. Als solche Antigene wären die Onkogenprodukte der aktivierten Onkogene besonders geeignet, insbesondere solche, die ihr Onkogen-Produkt in der Zellmembran haben und solche, die in den normalen Zellen überhaupt nicht vorkommen, wie zum Beispiel die durch Punktmutation veränderten Onkogen-Produkte oder einige Tumormarker. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Onkogen-Transkripte bzw. deren Sequenzen so früh nachzuweisen sind, wie dies mit der empfindlichsten Immunmethode nicht möglich ist.

Der immunologische Nachweis von Produkten der Onkogene als Malignitätstest ist nicht geeignet, weil die normalen und die pathologischen Werte (in Bösartigkeiten) einander überlappen, und einige abnormale aber nicht-malignante Zustände höhere Werte produzieren als die Bösartigkeiten, einmal abgesehen von der wesentlich niedrigeren Empfindlichkeit der immunologischen Verfahren im Vergleich zu der jetzigen Erfindung.

Ein weiterer besonderer Vorteil ist noch, daß Veränderungen in der Aktivierung der Onkogene während der Verlaufskontrolle noch zuverlässiger und früher reflektiert werden können durch das Plasma-Onkogen-Profil als die bei bisherigen Methoden. So kann man Onkogen-Veränderungen die mit einer Verschlechterung der Prognose wegen Diversifikation der Krebszellen, oder mit einer Amplifizierung einer der aktivierten Onkogene verbunden sind, schon frühzeitig erfassen und die entsprechende Therapie rechtzeitig einleiten. Das Verschwinden eines vorhandenen Onkogen-Transkripts oder Erscheinen eines neuen, im Blutplasma noch nicht vorhandenen Onkogen Transkripts bzw. dessen Sequenz ist auch ein Zeichen der Verschlechterung der Progressivität. Wenn die Proportion von zwei oder mehreren Onkogentranskripten zueinander sich im Blutplasma während der Verlaufskontrolle wesentlich verändert, kann dies die Amplifizierung in vivo eines der Onkogene reflektieren, was meistens eine Erhöhung der Aggressivität und erhöhte Progressivität der Bösartigkeit bedeuten könnte.

Der Mechanismus des Phänomens "Phänotypausleih" praktiziert durch die Natur, kann für therapeutische Zwecke durch Verabreichung von mRNA-Lipoprotein Komplexen nachgeahmt und ausgenützt werden, um

1. die fehlende Produktion von Substanzen zu substituieren,
2. die Produktion einer Substanz oder mehrerer Substanzen zu erhöhen und so einen pathologischen Zustand zu bekämpfen,
3. oder die Produktion solcher Substanzen zu ermöglichen, die in dem menschlichen Organismus nicht vorkommen, aber therapeutisch vorteilig wäre.

Diese Therapiemöglichkeiten haben den großen Vorteil, daß die Wirkung steuerbar ist und durch Abbrechen der Verabreichung jederzeit beendet werden kann, im Gegenteil zum genetischen Transfer mit DNA, das aus mehreren Gründen an Patienten (Menschen) sowieso nicht praktikierbar ist.

Die Therapiemöglichkeit mit mRNA benötigt aber ein sorgfältiges Monitoring der angewandten mRNA bzw. deren spezifische Sequenz in der Blutbahn. Das Verfahren der Erfindung ist wegen seiner sehr hohen Empfindlichkeit und zuverlässigen Spezifität für diese Zwecke sehr geeignet.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, spezifische mRNA-Sequenzen der Substanzen von Krebszellursprung aus einer azellularen biologischen Flüssigkeit nachzuweisen, auch wenn sie bzw. deren Fragmente in sehr niedriger Konzentration vorhanden und in gewissem Maß degradiert sind, aber die spezifische Sequenz haben und für in vitro Amplifizierung geeignet sind, und dieses Verfahren so als Malignitätstest, besonders als sehr empfindlichen Früherkennungstest, zu verwenden.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren nach Anspruch 1 gelöst. Durch die Verwendung eines wirksamen und zuverlässigen, aber RNA-Austritt aus den Zellen nichtverursachenden RNase-Hemmers schon bei der Probenentnahme der zellularen biologischen Flüssigkeit, wird der Abbau der RNA bzw. deren Fragmente verhindert. Da der gewählte RNase Hemmer keinen RNA-Austritt aus den Zellen vor und während deren Entfernung verursacht, ist darum wichtig, weil diese sensitive Methode schon kleine Kontamination nachweisen kann.

Die PCR-Produkte können schon während der PCR durch Einbauen von markierten Bauelementen oder Primeren radioaktiv oder nicht-radioaktiv

markiert werden und so visualisiert werden. Die nicht-markierten PCR-Produkte können durch direkten Nachweis nach Ethidium Bromid Färbung, oder durch ihre Größe, oder entsprechend ihrer Sequenz entweder durch Sequenz Analyse oder besonders mit in vitro Hybridisierung identifiziert werden.

So wird ein hoher Grad von Empfindlichkeit, eine äußerst große Spezifität, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit erreicht. Wegen der Besonderheiten der bösartigen Zellen und Tumore ist das Verfahren als Malignitätstest, insbesondere für Früherkennung, geeignet.

Im folgenden wird die Erfindung genauer erklärt. Die zelluläre biologische Flüssigkeit (wie Blut, Exudate usw.) wird mit einem zuverlässigen, RNA-Zell-Leckage nicht verursachenden RNase-Hemmer schon bei der Probenentnahme gemischt und die Zellen werden entfernt. Aus der so gewonnenen, azellulären biologischen Flüssigkeit wird die Gesamt-RNA unter ständiger Wirkung des RNase Hemmers und in Anwesenheit eines Detergens und einem proteolytischen Enzym, wie Proteinase K, mit einem wässrigen Medium vermischt und bei 37 Grad C für 5 bis 8 h in einer Pufferlösung inkubiert. Dann wird Hefe tRNA als Carrier (50 ug/ml) zugemischt und mit Phäinol und Chloroform bei 60 Grad C extrahiert und mit Alkohol bei -20 Grad C präzipitiert. Das Extraktum kann durch Ion-Austausch Säulen Chromatographie noch schnell weiter gereinigt werden.

Die Blutplasma-RNA wird mit einer Pufferlösung vermischt, die zusammengeetzt ist entsprechend der optimalen Wirkungsweise der gewählten Revers-Transkriptase (Tris.Cl. ph 8.3, KCl, MgCl₂), weiter enthält sie RNasin, Revers-Transkriptase Enzym, jede von den vier Deoxyribonukleosid-triphosphaten, das 3'Primer alle in ausreichender Konzentration. Dann wird die Gesamt-Reaktionsmischung insgesamt 20 Mikroliter, bei 37 Grad C für 30 min inkubiert.

Danach wird die Reaktionsmischung mit 80 Mikroliter PCR-Puffer und 100 Mikrogramm Rinderserumalbumin, mit dem 3'Primer und dem 5'Primer sowie dem thermostabilen Taq DNA-Polymerase Enzym, jeweils in geeigneter Konzentration, gemischt. Die Reaktionsmischung wird dann mit Mineralöl überschichtet, um die Evaporation zu verhindern. Durch Erhitzen der Reaktionsmischung auf 95 Grad C für 20 sec wird der RNA.cDNA Komplex

dissoziiert, und Annealing der Primere wird bei 55 Grad C für 15 sec durchgeführt. Die Extension der Primere erfolgt bei 72 Grad C für 1 min. Durch Erhitzen wird der Zyklus wieder gestartet und 40 bis 50 mal wiederholt.

Nach dem letzten Zyklus wird die Reaktionsmischung bei 72 Grad C für 10 min belassen und dann in Eis gekühlt.

Stattdessen der Vermehrung während PCR wird durch Ethidium Bromid Färbung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nachgewiesen. Das Produkt bzw. die Produkte können nach ihrer Größe durch Elektrophorese in Gel oder durch Chromatographie oder entsprechend ihrer Sequenz identifiziert werden.

Die Produkte können während der Amplifizierung durch markierte Bauelemente oder Primere mit Radioisotop, Biotin, Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder anderen Substanzen markiert und dann entsprechend der Markierung erkannt werden.

Identifizierung der PCR Produkte mit höchster Empfindlichkeit und mit größter Spezifität wird durch in vitro Hybridisierung erreicht.

10 Mikroliter von jeder Reaktionsmischung wird auf Nylon- oder Nitrocellulose-Filter aufgetragen und durch Backen bei 80 Grad C für 60 min immobilisiert, bei 60 Grad C im geeigneten Puffer Prehybridisiert und dann in Anwesenheit von 2×10^6 cpm von endmarkierten Onkogenspezifischen Oligonukleotid Proben pro ml für 5 bis 7 h bei 60 Grad C hybridisiert. Wäsche wird bei 60 Grad C in 0.75 M NaCl/0,075 Na-citrat, 0.1 % SDS durchgeführt. Das Resultat der Hybridisierung wird durch Autoradiographie visualisiert.

Durch eine Variante dieser Methode, die eigentlich deren Spiegelbild ist, können die Produkte der Simultan-Pooled PCR gleichzeitig identifiziert werden. Die unmarkierten entsprechenden Proben werden auf einem festen Träger, wie Nylon Filter, immobilisiert und mit den (Biotin) markierten PCR Produkte in Kontakt gebracht, um miteinander zu hybridisieren. Die Resultate werden durch Enzymaffinität bedingte Farbreaktion visualisiert.

Eine Reihe von gereinigter molekular-klonierter DNA, die die Sequenz als Code der Onkogene enthält, wird entweder radioisotopisch oder nicht-radioisotopisch markiert (j.Mol.Biol. 113:237-251 1977). Die nicht-radioisotopische Markierung kann mit Biotin geschehen. Im Fall von Oligonukleotid-Proben wird durch Endmarkierung durchgeführt, um hohe spezifische Aktivität zu erreichen.

DNA Proben und Onkogen-spezifische Oligonukleotid-Proben markiert oder unmarkiert sind kommerziell erhältlich (ONCOR, Inc. Gaithersburgh, Ma. 20877, USA; ONCOGENE SCIENCE Inc. Mineola, NY 11501, USA; Amersham, Little Chalfont, England). Ein Biotin Markierungs- und Visualisierungskit wird kommerziell angeboten (Amersham, Little Chalfont, England ONCOR, Gaithersburgh, USA). Oligonukleotide mit den jeweiligen gewünschten Sequenzen kann man bei der Custom-Service in Europa und in den USA bestellen und erhalten.

Alle Maßnahmen werden unternommen, um die Kontamination mit der jeweiligen Target-Sequenz vor, während und nach den Untersuchungsprozessen zu verhindern.

Die Gefahr einer Zumischung des ubiquitären, hochgradig resistenten RNase-Enzyms aus exogenen Quellen wird besonders in allen Etappen der RNA-Phase des Verfahrens (Stufen a bis c) durch Gebrauch von gebackenen Glaswaren, autoklavierten Lösungen, gebackenen Spatulas, Werkzeugen, trockenen chemischen Präparaten, von Glas destillierten, mit autoklavsterilisiertem Wasser, sowie Tragen von Handschuhen verringert.

Das folgende Beispiel dient der weiteren Erläuterung der Erfindung ohne sie zu beschränken.

Beispiel

Es wird 10 ml Blut mit 20 IE Heparin entnommen und sofort mit einer Lösung von RNase-Hemmer wie RNasin (Promega Biotec Maidison WI. USA) Endkonzentration 2000 E/ml) vermischt. Das Blutplasma wird so schnell wie möglich separiert. Es wird in zwei Einweg-Plastik Centifugen-Röhr-

chen je 2.5 ml Blutplasma pipettiert, eines wird tiefgekühlt für eventuelle Wiederholung, oder für ergänzende Untersuchungen als Reserve aufbewahrt. Das andere wird gleich in Bearbeitung genommen.

Es wird ein Gemisch aus 0.2 M Tris.Cl (pH 8.5); 25 mM Äthylendiaminotetraessigsäure (EDTA); 2 % (Gew/vol) Natriumduodecylsulfat (SDS) und Proteinase K (Endkonzentration: 300 mikrogramm/ml) hinzugefügt und in der Anwesenheit von RNase-Hemmer bei 37 Grad C für 5 bis 8 h inkubiert.

Anschließend wird Hefe tRNA (50 ug/ml) zugemischt und danach wird ein gleiches Volumen Phänol und Chloroform-Isoamylalkohol (24 : 1) zugemischt und bei 60 Grad C für 15 min durch kräftiges Schütteln extrahiert. Die Interphase wird zusätzlich einmal wie oben extrahiert und die kombinierte wässrigen Phasen werden einmal mit Chloroform-Isoamylalkohol wie oben aber bei Zimmertemperatur behandelt. Die Nukleinsäure wird durch Alkohol in der Anwesenheit von Na-acetat (0.3 M, pH 5.2) bei -20 Grad C precipitiert und zentrifugiert. Das Sediment wird aufgelöst und einer RNase-freien DNase Enzym Behandlung unterzogen.

In diesem Falle wird RNase-freies DNase-Enzym und $MgCl_2$ (zu 2 mM) zu der Plasma-RNA Lösung (50 mM Tris.Cl, pH 7.5 in 1 mM EDTA) vermischt und in Anwesenheit von RNase-Hemmer bei 37 Grad C für 30 min inkubiert, dann wird Phänol-Chloroform extrahiert und in Anwesenheit von Na-azetat (pH 5.2, 0.3 M) wird die RNA mit 70 % Äthanol bei -20 Grad C precipitiert.

Vor der DNase Behandlung kann ein weiteres Reinigungsverfahren durch Ion-Austausch-Säulen-Chromatographie ("The Extractor", Molecular Biosystem, San Diego, CA 92121) in ca. 30 min entsprechend der Vorschriften des Herstellers durchgeführt werden.

Wenn man die Extraktion der RNA aus der RNA-Lipoprotein Fraktion durchführt, erhält man eine RNA-Fraktion, die vorzugsweise Poly (A)⁺RNA aufweist. Die RNA-Lipoprotein Fraktion kann man aus dem Serum von Malignomträgern durch Flotation in KBr Density-Gradient (diskontinuierlich: 1.006 - 1.221 g/ml) nach 16-stündiger Flotation in einer Ultrazentrifuge bei 105.000 x g trennen, sie wird als ein opales Band

zwischen den HDL und LDL Fraktionen sichtbar.

Das Eluat kann direkt für in vitro Hybridisierung oder für PCR Amplifizierung, oder nach Alkohol Präzipitation und DNase Behandlung verwendet werden.

Danach wird das Sediment in einer Pufferlösung, die der optimalen Wirksamkeit des verwendeten Revers-Transkriptase Enzyms (und der Vorschriften des jeweiligen Herstellers) entspricht (Bethesda Research Laboratories; promega Biotec, USA) (50 mM Tris.Cl, pH 8.3, 6mM MgCl₂, 40 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol, 1 E RNasin). Die Lösung wird mit 1 mM von jedem Deoxyribonukleosid-Triphosphat und 1000 E Revers-Transkriptase, 10 pM von dem jeweiligen 3'PCR Primer auf 100 µl ergänzt.

Für jede Target-Sequenz bzw. jedes Pooled-Target Sequenz System werden 20 µl von dieser Reaktionsmischung bei 37 Grad C für 30 min inkubiert.

Zu dieser Reaktionsmischung werden 80 Mikroliter von PCR-Puffer (50 mM Tris.Cl, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 100 Mikrogramm Rinderserum-albumin/ml, pH 8.4 40 pM 3'Primer, 50 pM 5'Primer und 1 E thermostabiles Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer-Cetus, USA; New England Biolab, (USA)) hinzugemischt. Mineralöl wird über die Reaktionsmischung geschichtet, um die Evaporation zu verhindern.

Durch Erhitzen auf 95 Grad C für 20 sec wird der RNA-cDNA-Komplex dissoziiert und Annealing der Primere erfolgt bei 55 Grad C für 15 sec, die Extension der Primere läuft bei 72 Grad C für 1 min ab. Durch Erhitzen wird der Zyklus erneut begonnen und 40 bis 50 mal wiederholt.

Nach dem letzten Zyklus wird die Reaktionsmischung bei 72 Grad C für 10 min belassen und dann in Eis gekühlt. Das Instrument "Thermal Cycler" (Perkin-Elmer-Cetus, USA) erleichtert bedeutend die zuverlässige und schnelle Ausführung der PCR.

Primerpaare, um PCR Produkte von verschiedener Größe zu synthetisieren.

Ein Beispiel:

Primerpaar für Ha-ras12	Sequenz	Größe des amplifizierten Produktes in Basispaar (bp).
5'Primer (Sequenz)	GACGGAATATAAGCTGGTGG	63
3'Primer (Sequenz)	TGGATGGTCAGCGCACTCTT	

Primerpaar für Ki-ras12

5'Primer (Sequenz)	GACTGAATATAAACTTGTGG	108
3'Primer (Sequenz)	CTATTGTTGGATCATATTCC	

Primerpaar für Ki-ras61

5'Primer (Sequenz)	TTCCTACAGGAAGCAAGTAG	128
3'Primer (Sequenz)	CACAAAGAAAGCCCTCCCCA	

Eine Markierung des PCR Produktes wird während der Amplifizierung durch Einbau entweder von markierten Deoxyribonukleosid Triphosphat oder von markierten Primern durchgeführt. Die Markierung kann radioaktiv oder nichtradioaktiv sein wie zum Beispiel: Biotin, Enzyme, Farbstoffe und andere Substanzen. Eine vorteilhafte Verwendung als Markierung für Primere haben Fluoreszenzfarbstoffe gefunden: Diese Farbstoffe, für jede amplifizierende Sequenz eine andere Farbe, werden zu den Oligonukleotid Primern konjugiert (Applied Biosystem, Foster City, Ca, USA).

Der Nachweis der PCR Produkte, bzw. die Feststellung des Stattfindens der Amplifizierung ist durch mehrere Verfahrensweisen möglich:

Direkt-Methode nach Ethidium Bromid Färbung: Erst müssen die uninkorporierte Bauelemente und Primere entfernt werden. Die Reaktionsmischung wird zu 2.5 ml mit 10 mM Tris.Cl pH 8.0 verdünnt und auf ein Centricon -100 Microfiltration Rohr (Amicon) beladen und bei 5000 rpm zentrifugiert (Sorvall SS35, fixed angle rotor). Die amplifizierte DNA kann von dem Oberteil des Filters (45 - 50 ul) zurückgewonnen werden. Ca. 5 ul werden dann auf einer Agarose-Platte, die 0.5 ug/ml Ethidium Bromid enthält, aufgetragen und durch UV Transluminator induzierte Fluoreszenz im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (gleiche Zusammensetzung minus Plasma RNA, gleiche Behandlung) visualisiert und

ausgewertet.

1. Markierte PCR Produkte werden durch ihre Markierung identifiziert. In diesem Fall müssen die uninkorporierten markierten Elemente entfernt werden (wie oben).
 - a. Radioaktiv-markierte PCR Produkte werden durch Messen der Radioaktivität im Vergleich zur Negativ-Kontrolle bestimmt, oder nach Agarose Gel Elektrophorese ohne vorherige Behandlung durch Autoradiographie visualisiert und sogar durch die Größe des Produktes identifiziert.
 - b. Biotin-markiert PCR Produkte werden nach Eliminierung der nicht-eingebauten, markierten Elemente durch Enzymaffinität bedingte Farbreaktion erkannt. Visualisierungs-Kits werden kommerziell angeboten (ONCOR, Gaithersburgh, MD 20884 U.S.A.; Amersham, Little Chalfont, England).
 - c. Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte PCR Produkte werden durch ihre Farbe mit Fluorometer (Perkin-Elmer LS-5) identifiziert.
2. Nachweis unmarkierter Produkte durch ihre Größe:
Hier stehen zwei technische Möglichkeiten zur Verfügung. Vorherige Behandlung ist nicht notwendig:
 - a. Elektrophorese in Agarose oder Akrylamid Gel, entsprechend der Größe der Produkte. Visualisierung entweder durch EB-Fluoreszenz oder entsprechend der Markierung. Durch Vergleich mit parallel gelaufenen Marker mit bekannter Größe wird die Größe der Produkte bestimmt.
 - b. Ionen-Austausch-Chromatographie (High Resolution Separation):
Die Reaktionsmischung nach Amplifizierung wird auf eine Mono Q HR 5/5 Säule (Pharmacia Uppsala, Schweden) gegeben und durch den angegebenen Gradienten von Pufferlösung A und B mit einer Flow-Rate von 0,15 ml/min eluiert. Pufferlösung A: 20 mM Tris.Cl. pH 8.3, 0.4 % M NaCl; Pufferlösung B: A + 1.0 M NaCl. Gradient: 40 bis 60 % B in 2 h und 60 bis 80 % B in 6 h.

Simultan Multi-Target Sequenz PCR (Pooled PCR).

Dieses Verfahren verursacht spezielle Schwierigkeiten für die Identifizierung mehrerer PCR Produkte amplifiziert in derselben Reaktionsmischung in einem Röhrchen. In dieser Form von PCR werden mehr als eine Sequenz entweder desselben Moleküls bzw. Fragments oder eine Sequenz von mehreren verschiedenen mRNAs bzw. deren Fragmente simultan amplifiziert, wenn die entsprechenden Primer-Paare in ausreichender Konzentration vorhanden sind.

In diesem Fall wird mit EB Fluoreszenz zwar nachgewiesen, ob Amplifizierung stattgefunden hat oder nicht, aber welche Sequenz(en) amplifiziert wurde(n), muß mit besonderen weiteren Maßnahmen bestimmt werden. Im Fall der unmarkierten Produkte wird die Identifizierung durch die Produktgröße erreicht. Dazu wird vorher die Größe der verschiedenen PCR Produkte durch Auswahl und Einsetzen der entsprechenden Primer-Paare so programmiert, daß das Produkt von jeder amplifizierenden Target-Sequenz in einer individuellen, charakteristischen, voneinander unterschiedlichen Größe während der PR synthetisiert und amplifiziert werden (siehe Beispiel). So wird erreicht, daß die PCR Produkte durch ihre Größe mit Gel Elektrophorese oder durch Ionen-Austausch Chromatographie identifiziert werden.

Die zweite Möglichkeit ist die Differenzierung der Produkte durch Farbe, wenn sie unterschiedlich, jede mit eigener Farbe durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert wurden.

3. Die dritte Möglichkeit für die Differenzierung von simultan amplifizierten Produkten ist die Identifizierung durch ihre Sequenz. Hier ergeben sich drei Lösungen, welche auch geeignet und notwendig sind die Authentizität der Taq Polymerase Tätigkeit wegen die vorkommende "Misreading" und deren Amplifizierung zu kontrollieren:
 - a. Für Prüfung der Authentizität der Enzymtätigkeit ist besonders geeignet die Sequenz Analyse.
 - b. Im Prinzip kommt die Scanning-Tunelling Mikroskopie für die Identifizierung der PCR Produkte in Frage. Zur Zeit ist es

möglich, mit dieser Mikroskopie nur die Purin und Pyrimidin Bases voneinander zu differenzieren. Durch die Verbesserung der Auflösungsfähigkeit des Mikroskops wird es in der nächsten Zukunft möglich sein, die verschiedenen Basen zu identifizieren, sogar aus einem konzentrierten RNA bzw. DNA Extrakt.

- c. Die in vitro Hybridisation ist die meist praktizierte Methode für Identifizierung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Sequenz, und zwar in ihrer konventioneller Form wie Dot-, Slot-, oder Southern-Blot. In dieser Form wird das PCR Produkt auf einem festen Substrat immobilisiert und wird mit frei in Lösung vorhandenem markiertem spezifischen Oligonukleotid oder DNA Proben in Kontakt gebracht um miteinander, wenn komplementäre Sequenz vorliegt, zu hybridisieren. Die unspezifisch gebundenen Proben werden durch Wäsche entfernt.

Aus jeder Reaktionsmischung wird 20 Mikroliter auf vorher mit 20 x SSPE befeuchtetem Nylon oder Nitrocellulose Filter mit einem Dotting-Apparat unter Einwirkung eines milden Vakuums aufgetragen, dann werden die Filter in kleinem Volumen von 20 x SSPE Lösung gewaschen und durch Backen bei 80 Grad C für 60 min immobilisiert. Dann werden die Filter in einer Lösung von 0.75 M NaCl, 0.075 M Natrium-citrat, pH 7.0, 20 mM Naphosphat, pH 7.0, 5 mM EDTA, 200 Mikrogramm/ml Hefe-tRNA, 1 % Sarkosyl (Sigma) für 60 min bei 60 Grad C prehybridisiert. Der Puffer, in dem die Prehybridisierung geschah, wird entfernt und mit dem Puffer von derselben Zusammensetzung, der noch 2×10^6 cpm/ml von 5'-End-markierten, denaturierten Oligonukleotiden mit Onkogen-spezifischer Sequenz, oder mit der Sequenz, die das mutierte Kodon eines Onkogens (wie ras Onkogene) enthält, zugemischt und wird bei 60 Grad C für 6 bis 8 h inkubiert um die Hybridisierung stattzufinden. Danach werden die Filter einer Wäsche in einer Lösung von 0.75 M NaCl, 0.075 M Na-citrat, 0.1 % SDS bei 60 Grad C unterzogen. Die Visualisierung des Stattfindens der Hybridisierung wird durch Autoradiographie mit Hilfe eines Verstärkerschildes erreicht.

Im Fall von Onkogen-Oligonukleotid-Proben, die die Sequenz mit dem mutierten Kodon (wie Ki-ras, Ha-ras, N-ras, Kodon 12, 13, 61) ist es vorteilhafter, wenn die Pufferlösung für Prehybridisierung, Hybridi-

sierung und Wäsche noch Tetramethylammonium-Chlorid enthält (3 M Tetramethyl-ammonium-Chlorid, 50 mM Tris.Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.3 % SDS, 100 Mikrogramm/ml sonizierte Salmon-Sperma-DNA, 5 x Denhardt's Lösung (1 x Denhardt's Lösung: Ficoll, Polyvinylpyrrolidon, Rinderse- rum-albumin je 0.02 %), durchgeführt. Die Filter werden in diesem Fall dann zweimal einer Wäsche in 2 x SSPE (1 x SSPE: 10 mM Na-phosphat, pH 7.2, 0.18 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS) für 10 min bei Zimmertempera- tur unterzogen, dann werden sie mit 3 M Tetramethylammonium-Cl-Hybri- disierungspuffer minus Karrier-DNA und Denhardt's Lösung abgespült und danach in dieser Lösung für 30 bis 60 min bei 60 Grad C gewaschen. Die Filter werden durch Autoradiographie ausgewertet, wie oben.

Die folgenden bekannten, 18 molekular klonierten menschlichen Onkogene bzw. deren Onkogen-spezifischen Sequenzen können als Proben gebraucht werden. Die Onkogene sind hier unten ungefähr nach Häufigkeit ihres Vorkommens erhöhter Aktivität in menschlichen Bösartigkeiten grup- piert:

Gruppe A: fos, myc, Ha-ras, Ki-ras

Gruppe B: fes, myb, fms, N-ras, src, abl, raf, Erb^B, N-myc

Gruppe C: Erb^A, mos, sis, alu, bcr.

Die Onkogen Proben werden radioisotopisch meistens mit P³² (Spezifi- sche Aktivität: 10⁸ - 10⁹ cpm/Mikrogramm) oder mit Biotin markiert. Okogen-Oligonukleotid Proben inklusiv solche, die durch Punktmutation veränderte Sequenz von durch Punktmutation aktivierten Onkogenen auf- weisen, werden radioisotopisch durch Endmarkierung markiert, um hohe spezifische Aktivität zu erreichen. Sollten neue Onkogene entdeckt werden, wären gegebenenfalls weitere Onkogen-Oligonukleotid Proben notwendig, die entsprechend des diagnostischen Zieles verwendet werden können.

Es gibt ein in vitro Hybridisierungsverfahren, was das Spiegelbild der oben genannten konventionellen Methode ist. Bei diesem werden die unmarkierten vershierten Oligonukleotid Proben auf einem Stück Nylon- Filter immobilisiert und der Filter wird mit PCR Produkten, die wäh- rend der Amplifizierung dann mit Biotin markiert geworden sind, hybri- disiert; Revers-Hybridisationsverfahren.

100 μ l Oligonukleotide Probe Lösung (100 pmol; in 10mM Tris.Cl. 0.1 mM EDTA) wird auf Nylon filter (Membran) (Genetrans-45, Plasco Woburn, MA. USA) aufgetragen und durch UV Licht oder durch Backen immobilisiert, dann wird einer Wäsche mit 200 ml 5 x SSPE und 0.5 % für 30 min bei 55 Grad C um das nichtgebundene Oligonukleotid zu entfernen. Ein Filter hat mehrere verschiedene Oligonukleotide Proben.

Jeder Filter mit den daran immobilisierten verschiedenen spezifischen Oligonukleotid-Proben wird in 4 ml von Hybridisationslösung zusammengesetzt von 20 μ l der amplifizierten, markierten (Biotin) DNA und von 5 x SSPE, 0.5 % SDS. Vorher wurde die amplifizierte DNA durch Mischung von 400 mM NaOH, 10 mM EDTA und wurde so schnell zu der Hybridisationslösung zugegeben. Dann wird bei 55 Grad C für 4 bis 6 h inkubiert. Die werden schnell mit 2 x SSPE, 0.1 % SDS bei Zimmertemperatur, einmal mit derselben Lösung bei 55 Grad C für 10 min. gewaschen und einer kurzen Spülung zweimal in 2 x PBS (1 x PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) bei Zimmertemperatur. Visualisierung entsprechend der Markierung.

Oligonukleotide, die mit einem poly-dT Tail (Schwanz) gekoppelt sind (mehrere Hundert BP lang): Durch diesen Schwanz werden dann die Proben auf einem Stück von Nylon Filter durch UV Licht immobilisiert, so daß die spezifische Sequenz oder Sequenzen des Fragments frei in Lösung ist und so die Hybridisierung schnell stattfindet.

Die Punktmutationsmöglichkeiten einiger Onkogene sind zahlreich und benötigen schnelle Untersuchungsverfahren. Eine Möglichkeit ist die simultan, Pooled-Sequenz PCR und die Differenzierung der verschiedenen Produkte durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoff-Markierung, durch Benutzung markierter Primer-Paare, ein Primer davon ist mit einem anderen Farbstoff markiert und komplementär zu der mutierten Sequenz. Jede 5 bis 6 mutierte Sequenz ist durch eigene Farbstoffe, eigene Farbe gezeichnet. So können in einem pooled PCR-System die Amplifizierung dieser mutierten Sequenzen identifiziert werden und zwar schnell und einfach.

Die PCR kann bei solchen Substanzen, deren Nukleotid Sequenz nicht

bekannt ist, nicht durchgeführt werden. In diesen Fällen ist die in vitro Hybridisierung mit den entsprechenden DNA Proben die Methode der Wahl.

Das Plasma-RNA Konzentrat wird durch Inkubierung bei 65 Grad C für 15 min und dann durch rasche Abkühlung denaturiert. Danach wird die RNA auf einem festen Träger wie Nitrocellulose-Papier, das zuvor mit 20 x NaCl/Cit. equilibriert und dann getrocknet wurde durch einen Dotting Apparat (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire USA) aufgetragen. Danach wird das so behandelte Nitrocellulose-Papier für 2 h bei 80 Grad C im Vakuumofen gebacken, nach dem Backen wird in einer Lösung (Prehybridisierungspuffer): Formamide (50 % (Vol/Vol) 5 x NaCl/Cit; 50 mM Natriumphosphat, pH 6.5; sonizierte denaturierte Salmon-Sperma DNA (250 Mikrogramm/ml) und 0.2 % je Bovine Serum Albumin (BSA); Ficoll und Polyvinylpyrrolidon für 6 - 8 hr bei 55 Grad C inkubiert.

Die Biotin markierten Onkogen und anderen Proben (markierte Proben bzw. Markierungs-Kit: ONCOR, Gaithersburgh, USA) werden erst denaturiert und werden zu der Prehybridisierungslösung, die das Nitrocellulose-Papier mit der daran immobilisierten Plasma-RNA enthält, gemischt. Die Konzentration der Probe bzw. der Proben (Pooled Proben) ist hoch: 600 ng/ml. Im Fall der Pooled Proben von 5 Komponenten, je 120 ng/ml. Hybridisierung bei 55 Grad C für 7 bis 10 h.

Das Stattfinden der Hybridisierung wird mit Visualisierungskits entsprechend der Herstellervorschriften (ONCOR, Gaithersburgh USA), nach den vorgeschriebenen Wäuschen nachgewiesen.

Verwendung Biotin markierter Proben und Visualisierungskits von ONCOR ermöglicht die Rehybridisierung nach Entfernung der hybridisierten Proben.

Mit den Pooled-Proben (je 5) kann die Plasma-RNA mit dem in menschlichen bösartigen Krankheiten häufigsten aktivierten Onkogene relativ schnell getestet werden und ein negatives oder ein positives Testergebnis bekommen. Das positive Pool wird dann mit dessen Komponenten (die individuellen Proben) durch Hybridisierung und/oder durch Rehybridisierung weiter getestet um das Plasma Onkogen-Profil zu bestimmen.

men.

Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt im Bereich von 0.1 pg. Es sind zahlreiche weitere Modifizierungen möglich.

Intensität des schwarzen Flecks nach Autoradiographie durch die Intensität der Farbe kann quantitativ gemessen werden und so kann man quantitative Vergleiche machen.

Quantitativer Test:

Es wird aus der Plasma-RNA eine Serienverdünnung gemacht mit 10 Mikrogramm/ml Hefe-tRNA als Diluent Carrier RNA, dann wird mit jeder Verdünnung erst die Revers-Transkription, dann die PCR durchgeführt und das Produkt durch in vitro Hybridisierung mit entsprechenden spezifischen Oligonukleotiden-Proben durch andere Methoden identifiziert. Die höchste Verdünnung, aus der noch ein positives Signal ausgeht, ist der Titer. So können bei der Verlaufskontrolle eines Patienten, während der Beobachtungszeit, quantitative Vergleiche durchgeführt werden. Auf diese Weise kann man zum Beispiel Amplifizierung eines der aktivierten Onkogene beobachten. Wenn während der Verlaufskontrolle der Titer eines Onkogens im Vergleich zum anderen in den Plasma nachweisbaren Onkogenen unproportionell erhöht wird, kann das die in vivo Amplifizierung dieses Onkogen u.a. bedeuten.

Diese Methode ist besonders geeignet für Screening von Personen, die durch Malignität besonders gefährdet sind, wie Personen die Röntgen oder Radioaktiv-Strahlung ausgesetzt sind, Arbeiter in Chemischen oder Asbest-Betrieben, Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem (nach Chemotherapie) oder Mitglieder der Familien mit genetisch-bedingter Neigung für verschiedene bösartige Krankheiten.

Wegen der erhöhten Sensitivität dieser Methode können solche nicht bösartige Fällen vorkommen, in den der Malignitätstest, ein positives Ergebnis liefert. Die Differenzierung ist durch die Verlaufskontrolle möglich. Bei nicht-bösartigen Fällen persistiert die Positivität vorübergehend, klingt dann ab, im Gegenteil zu den bösartigen Fällen, wo die Positivität persistiert und dann steigt.

Die gleichzeitige Vermehrung von mehreren Target-Sequenzen erleichtert die Untersuchung der großen Anzahl von Substanzen wie Onkogene, oder Varianten von Punktmutationen. Beispiel: Drei PCR Systeme (Pooled PCR), jeweils programmiert für 5 Target Sequenzen, davon zwei für die häufigst aktivierten Onkogene, und das dritte für andere Sequenzen von Krebszellursprung. EB Färbung zeigt in welchem System Amplifizierung stattgefunden hat und die vermehrte Sequenz(en) werden dann entsprechend ihrer Größe, wenn sie so programmiert wurden, durch Chromatographie oder Elektrophorese in Gel identifiziert.

Noch schneller geht es, wenn fluoreszenzfarbstoffmarkierte Primere für jede im Pool zu synthetisierende Sequenz eine eigene Farbe haben werden und die vermehrten Produkt(e) unter (mit) Fluorometer nach Entfernung der uninkorporierten markierten Primere ohne größere Verzögerung entsprechend ihrer Farbe identifiziert werden.

Dasselbe kann man tun mit den punktmultierten Sequenzen. Jede mutierte Sequenz in dem Pool wird mit eigener Farbe gezeichnet durch fluoreszenzfarbstoff-markierte Primer, welches komplementär für die mutierte Kodonregion ist.

Die höchst empfindliche Testmethode liegt vor, wenn man die PCR Produkte durch in vitro Hybridisierung nachweist. Im Fall der Pooled PCR wird die Reaktionsmischung nach Amplifizierung mit den entsprechend markierten Oligonukleotid bzw. Pooled DNA Proben hybridisiert. Die positive Pooled PCR Mischung wird dann mit markierten individuellen Oligonukleotid bzw. DNA Proben weiter hybridisiert, um zu wissen, welche Sequenz in dem Pool amplifiziert wurde. So kann man eine Empfindlichkeit erreichen, die in dem Bereich von 10^{-18} g liegt. Theoretisch bedeutet das die Nachweisbarkeit von einigen Target-Sequenzen (3 - 5 Target-Sequenzstücke) in dem Plasmamuster.

Durch dieses höchst empfindliche und im größten Maße spezifische Nachweisverfahren für die spezifische mRNA-Sequenz der Substanzen von Krebszellursprung entsteht ein Malignitätstest, der wegen der Besonderheiten der bösartigen Zellen und Tumore für Diagnostik, Früherkennung, Screening und für Vorhersagen von Therapieausgang mit antineo-

plastischen Mitteln geeignet ist.

Dieser Test ist fähig, nicht nur die fundamentalen molekular-genetischen Veränderungen, hauptsächlich verantwortlich für die bösartige Transformation, deren Aufrechterhaltung und Progression, sondern auch eine der wichtigsten Beeinflussungsweisen des Wirtorganismus durch die bösartige Krebszellpopulation, zu reflektieren.

Um Heilung zu erreichen, müssen beide Geschehnisse (Mechanismen) bekämpft werden:

Die aktivierten Onkogene treiben den "Motor" der bösartigen Zellen hoch, die müssen "zurückgeschaltet" werden um den Wirt, den Patienten retten zu können.

Die Beeinflussung des Wirtorganismus durch die Krebszellpopulation auf die hier angegebene Weise, die zu der Schwächung der Abwehr und anderer Funktionen des Wirtes führt, muß verhindert werden .

Dazu schafft dieses Verfahren der Erfindung die wichtigste Voraussetzungen: Das frühzeitige Erkennen dieser Geschehnisse in jedem Patienten individuell.

A n s p r ü c h e

1. Malignitätstest (Krebs-Test) durch in vitro enzymatische Vermehrung der spezifischen mRNA Sequenz der Substanzen von Krebszell-Ursprung aus einer azellulär biologischen Flüssigkeit, bei dem man
 - a. aus der azellulären biologischen Flüssigkeit die RNA unter ständiger Wirkung eines zuverlässigen RNase-Hemmers konzentriert,
 - b. das Produkt der Stufe a. einer in vitro Reverstranskription unterzieht, um die komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren,
 - c. das Produkt der Stufe b. benutzt, um die Target-spezifische Sequenz der gewünschten Substanz von Krebszell-Ursprung enzymatisch in vitro wiederholt zu synthetisieren und so zu vermehren, und
 - d. das Produkt der Stufe c. durch Bestimmung der Vermehrung der Nuclein Säure nachweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das Produkt der Stufe a. einer in vitro Hybridisierung mit dem gewünschten Oligonukleotid oder der DNA Probe vor der Stufe b. unterzieht.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in vitro Vermehrung des Produkts der Stufe b. durch Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-chain-reaction = PCR) wiederholt durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die azelluläre biologische Flüssigkeit vorzugsweise menschliches Blutplasma ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die spezifische(n) Target Sequenz(en) zwei oder mehrerer Substanzen von Krebszell-Ursprung simultan in demselben System in vitro enzymatisch vermehrt (Pooled PCR).

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man bei der in vitro Simultan-Vermehrung mehrerer Substanzen von Krebszell-Ursprung jede Target-Sequenz für Synthese durch entsprechende Auswahl der Primerpaare so programmiert, daß jede in einer bestimmten, charakteristischen Größe synthetisiert.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß während der Pooled PCR die synthetisierenden Sequenzen durch Einbauen von mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Primern so markiert werden, daß jedes Target-Sequenz-Produkt eine eigene Farbe hat und entsprechend identifiziert wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die in vitro Vermehrung der Nuklein Säuren mit Ethidium-Bromid durch Farbreaktion bestimmt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Produkt der Stufe c. nach seiner spezifischen Sequenz durch in vitro Hybridisierung, durch Sequenz-Bestimmung oder durch Scanning-Tunnelling-Mikroskopie identifiziert wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Produkt der Stufe c. entsprechend seiner Größe durch Elektrophorese in Gel oder durch Säulen-Chromatographie identifiziert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Produkt der Stufe c. Anspruch 1 schon während der PCR markiert wird,
 - a. durch Benutzung markierter Primere, oder
 - b. durch Einbauen von markierten Nukleotiden, bei denen die Markierung radioisotopisch oder nicht radioisotopisch ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 und 3 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die in vitro Hybridisierung durchgeführt wird
 - a. mit markierten DNA - oder Oligonukleotid Proben während die durch PCR vermehrte(n), unmarkierte(n) Target-DNA oder Oligonukleotide entweder an einem festen Substrat immobilisiert oder frei in Lösung sind,

- b. oder die durch PCR vermehrte(n) Target-DNA oder Oligonukleotid ist markiert frei in Lösung und die verschiedenen Onkogen Proben sind unmarkiert auf einem festen Substrat immobilisiert,
wobei eine Hybridisierung nach entsprechender Behandlung durch den Nachweis der Markierungssubstanz bestimmt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2, 6, 9 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Probe eine individuelle DNA oder Oligonukleotid Probe oder eine Mischung individueller DNA oder Oligonukleotide nimmt (pooled probe).
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 9, 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die markierten Proben, die mit der auf dem festen Träger gebundenen Target-DNA oder Oligonukleotid hybridisierte, entfernt, um das feste Substrat mit der daran verbliebenen Target-DNA oder Oligonukleotid mit einer neuen DNA oder Oligonukleotid Probe zu hybridisieren, rehybridisieren.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 90/00102

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Int. Cl.⁵ C 12 Q 1/68</div>		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
<div style="text-align: center;">Int. Cl.⁵ C 12 Q</div>		
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Dialog Information Services, File 159, Cancer lit accession no. 89851433, Dobrovio A et al: "Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction", Blood; 72(6) 2063-5 1988	1-4

Y	WO, A1, 88/09385 (BALAZS, VIKTOR) 1 December 1988, see the whole document	1-14

Y	EP, A2, 0200362 (CETUS CORPORATION) 10 December 1986, see the whole document	1-14
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">07 May 1990 (07.05.90)</div>		Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">16 May 1990 (16.05.90)</div>
International Searching Authority <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">European Patent Office</div>		Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	EP, A2, 0272098 (CITY OF HOPE NATIONAL MEDICAL CENTER) 22 June 1988, see the whole document --	1-14
Y	WO, A1, 89/07149 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 10 August 1989, see the whole document -- -----	9

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/DE 90/00102**

SA 34427

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EPP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A1- 88/09385	01/12/88	NONE	
EP-A2- 0200362	10/12/86	AU-B- 586233	06/07/89
		AU-B- 591104	30/11/89
		AU-D- 5532286	02/10/86
		AU-D- 5532386	02/10/86
		CA-A- 1237685	07/06/88
		EP-A- 0201184	12/11/86
		JP-A- 61274697	04/12/86
		JP-A- 62000281	06/01/87
		US-A- 4683202	28/07/87
		US-A- 4683195	28/07/87
		US-A- 4800159	24/01/89
EP-A2- 0272098	22/06/88	NONE	
WO-A1- 89/07149	10/08/89	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/DE 90/00102**

I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.5 C 12 Q 1/68		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl.5	C 12 Q	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	Dialog Information Services, File 159, Cancer lit accession no. 89851433, Dobrovio A et al: "Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction", Blood; 72(6) 2063-5 1988 <div style="text-align: center;">--</div>	1-4
Y	WO, A1, 88/09385 (BALAZS, VIKTOR) 1 Dezember 1988, siehe Dokument insgesamt <div style="text-align: center;">--</div>	1-14
Y	EP, A2, 0200362 (CETUS CORPORATION) 10 Dezember 1986, siehe Dokument insgesamt <div style="text-align: center;">--</div>	1-14
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>¹⁰ * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
7. Mai 1990	16. 05. 90	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	<div style="text-align: center;"> Mme N. KUIPER </div>	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP, A2, 0272098 (CITY OF HOPE NATIONAL MEDICAL CENTER) 22 Juni 1988, siehe Dokument insgesamt --	1-14
Y	WO, A1, 89/07149 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 10 August 1989, siehe Dokument insgesamt -- -----	9

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/DE 90/00102

SA 34427

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 30/03/90
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A1- 88/09385	01/12/88	KEINE	
EP-A2- 0200362	10/12/86	AU-B- 586233	06/07/89
		AU-B- 591104	30/11/89
		AU-D- 5532286	02/10/86
		AU-D- 5532386	02/10/86
		CA-A- 1237685	07/06/88
		EP-A- 0201184	12/11/86
		JP-A- 61274697	04/12/86
		JP-A- 62000281	06/01/87
		US-A- 4683202	28/07/87
		US-A- 4683195	28/07/87
		US-A- 4800159	24/01/89
EP-A2- 0272098	22/06/88	KEINE	
WO-A1- 89/07149	10/08/89	KEINE	

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82